Aus dem Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Merker

Eine autoradiographische Untersuchung des Proliferations- und Migrationsverhaltens von Mesodermzellen während der Entstehung der oberen Extremität der Maus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Corinna Weber
aus
Bremerhaven

1985

Aus dem Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Merker

Eine autoradiographische Untersuchung des Proliferations- und Migrationsverhaltens von Mesodermzellen während der Entstehung der oberen Extremität der Maus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Corinna Weber
aus
Bremerhaven

Referent: Prof. Dr. med. H.-J. Merker

Korreferent: Prof. Dr. M. Vogel

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 12.3.85

Inhaltsverzeichnis

1.0. Einleitung 1

2.0. Material und Methoden 4
2.1. Tierstamm und Paarung 4
2.2. Lichtmikroskopie 4
2.3. Autoradiographie 4

3.0. Befunde 6
3.1. Tag 9 6
3.2. Tag 10 7
3.3. Tag 11 9

4.0. Diskussion 11

5.0. Zusammenfassung 19

6.0. Literaturverzeichnis 21

Bildanhang 25

Danksagung
Lebenslauf

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549619_0018

1.0. Einleitung

Die Entwicklung der oberen Extremität beginnt beim Mäuseembryo am Tag 9 der Schwangerschaft, etwa im 7. - 12. Somitenstadium (JURAND, 1965; THEILER, 1972). Beim menschlichen Embryo wird diese Entwicklungsstufe etwa am 26. Schwangerschaftstag, d.h. im 28. Somitenstadium, erreicht (STREETER, 1942; OTIS und BRENT, 1950). Der erste Schritt in der Entstehung der oberen Extremität ist eine Verdichtung des parietalen Mesoderms (Somatopleura) im Brustteil des Embryos unterhalb der Herzanlage (Übersicht s. JURAND, 1965; MILAIRE, 1965). Kurz darauf kommt es zur lateralen Ausstülpung in diesem Bereich und damit zur Entstehung der Extremitätenknospe. Dieser Entwicklungsschritt ist bei der Maus etwa im 23. Somitenstadium (am Tag 9/10) erkennbar (THEILER, 1972). Am Tag 11 ist das Wachstum der Extremitätenknospe von proximal nach distal so weit fortgeschritten, daß die zukünftige obere Extremität in ihrer Grundform schon zu erkennen ist.

Histologisch besteht die Extremitätenanlage zu diesem Zeitpunkt noch aus locker angeordneten typischen polygonalen embryonalen Mesodermzellen. Umgeben sind sie von der Epidermis, die zu diesem Zeitpunkt aus zwei Zelllagen, der Basalzellschicht und dem Periderm, besteht (JURAND, 1965). Einen Tag später, d.h. am Tag 10, verdickt sich an der Spitze der Extremität die Epidermis zur sog. "apical ectodermal ridge" (AER). Dieser AER wird ein Induktionseinfluß bei der Extremitätenentwicklung zugeschrieben (AMPRINO, 1977; SAUNDERS, 1977).

Am Tag 11/12 sind erste Verdichtungszonen im Mesoderm erkennbar, bei denen es sich um Blasteme der späteren Knorpelanlage handelt. Am Tag 12 ist die Ausbildung der äußeren Form dann soweit vorangeschritten, daß die Form der Handplatte erkennbar wird.

Betrachtet man die einzelnen Schritte der Extremitätenentwicklung auf zellulärer Ebene, stehen zwei Fragen im Vordergrund des Interesses. Zum einen gilt es zu klären, aus welchen Bereichen des Embryos die Mesodermzellen stammen, die später Muskel-, Knochen- und Bindegewebe der Extremitäten bilden. Zum anderen ist es von Interesse, nach welchen Regeln und Mechanismen die für das Wachstum der Extremität erforderliche Zellvermehrung und Zelldifferenzierung vor sich geht.

Allgemein akzeptiert ist die Beteiligung der Somatopleura, d.h. des parietalen Mesoderms, an der Entstehung der vorderen Extremität (CHRIST und JACOB, 1980). Allerdings zeigten eine Reihe von Befunden, daß das Mesoderm für die genannten Strukturen möglicherweise nicht ausschließlich vom parietalen Mesoderm stammt, sondern auch Somitenmaterial an der Entstehung der Extremitäten beteiligt ist (GUMPEL-PINOT, 1974; CHRIST et al., 1974, 1977; CHEVALLIER et al., 1976). Die Rolle der Somiten bei der Extremitätenentwicklung war und ist seit langem umstritten (STRAUS und RAWLES, 1953; SAUNDERS, 1948; PINOT, 1970; CHRIST und JACOB, 1980). GRIM (1970) und GUMPEL-PINOT (1974) konnten eine Beteiligung von Somitenzellen bei der Entwicklung des Hühnerflügels zeigen. Anfang der 70er Jahre wiesen einige Autoren (MAUGER, 1970, 1972 a, 1972 b; MAUGER und SENGEL, 1970; KIENY et al., 1972; CHEVALLIER und SENGEL, 1973) auf die Rolle des Myotoms für die Extremitätenmuskulatur hin (CHEVALLIER und KIENY, MAUGER, SENGEL, 1977 b). Inzwischen gilt es als gesichert, daß zumindest beim Hühnerembryo die Muskelzellen der oberen Extremität somitischen Ursprungs sind. Zellen wandern aus den Somiten undifferenziert in die obere Extremität ein und differenzieren sich dort zu Muskelzellen (CHRIST et al., 1977; CHEVALLIER et al., 1977; CHRIST und JACOB, 1980; GUMPEL-PINOT, 1980). Während bisher davon ausgegangen wurde, daß es sich bei den Somitenzellen, die die Muskelzellen der Extremitäten bilden, um Myotomzellen handelt, weisen neueste Befunde (CHRIST et al., 1982) dahin, daß Dermatomzellen für die Entstehung der Skelettmuskulatur verantwortlich sind.

Fast alle bisher erwähnten Befunde wurden durch Untersuchungen an Hühnerembryonen gewonnen (CHRIST und JACOB, 1980). Da es an Säugetieren bisher nur wenige diesbezügliche Untersuchungen gibt (MILAIRE, 1965; JURAND, 1965), ist es nicht völlig sicher, inwieweit die an Hühnerembryonen gewonnenen Erkenntnisse über die Extremitätenentwicklung ohne weiteres auf Mäuseembryonen übertragen werden können. Aussagen über das Proliferations- und Migrationsverhalten im Rahmen der Extremitätenentwicklung wurden vor allem anhand von Huhn/Wachtel Transplantationsversuchen gewonnen. Bei Säugern besteht die Möglichkeit derartiger Versuche nicht. Es existieren allerdings Alternativen, um auch an Säugetieren das Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen zu untersuchen. Bewährt haben sich autoradiographische Untersuchungen der Zellkinetik, mit Hilfe der ^{3}H-Thymidinmarkierung (QUASTLER und SHERMAN, 1959).

Das Grundprinzip dieser Methodik besteht in der Markierung von Zellen mit radioaktiv markiertem Thymidin, das während der S-Phase im Rahmen der DNS-Synthese in die DNS eingebaut wird. Das dem Säugetierorganismus zugeführte ^{3}H-Thymidin, das nicht sofort in die DNS eingebaut wird, wird schon nach kurzer Zeit in das unmarkierte Thymin und in radioaktiv markiertes Wasser gespalten (SCHULTZE, 1968). Dadurch, daß durch diese Pulsmarkierung nur ein gewisser Anteil von Zellen markiert wird, lassen sich diese einmal markierten Zellen in ihrer Wanderung verfolgen. Diese Methodik hat allerdings auch ihre Grenzen: Je schneller die Zellen proliferieren, desto stärker verteilt sich die Markierung auf die Tochterzellen. Es tritt ein Verdünnungseffekt ein, d.h. die radioaktive Markierung der durch Teilung entstandenen Zellen wird immer schwächer; somit lassen sich schnell teilende Zellen nur eine gewisse Zeit verfolgen. Arbeiten an Hühnerembryonen mit dieser autoradiographischen Methodik liegen von LANGMAN und NELSON (1968) und LEWIS (1977) vor. Entsprechende Untersuchungen an Mäuseembryonen existieren dagegen noch nicht. Lediglich über die Zellkinetik von Zellen der Mäuseextremität in vitro liegen einige Ergebnisse vor (KOCHHAR, 1977; HERKEN, 1975, 1977, 1980).

Generell ergeben sich für die Zellvermehrung im Rahmen des Wachstums der Extremitäten zwei theoretische Möglichkeiten: Zum einen könnten Zellen vermehrt aus dem embryonalen Stamm in die Extremitäten hineinwandern. Zum anderen könnte das Wachstum der Extremität durch lokale Zellvermehrung innerhalb der Extremität gesteuert werden. SEARLS (1967) kam bei seinen Untersuchungen am Hühnerembryo zu dem Ergebnis, daß keine Migration von Zellen in die sich entwickelnde Extremität nachweisbar ist. Auch Untersuchungen an Mäuseembryonen (MILAIRE, 1965) ergaben keine sicheren Hinweise auf eine Wanderung von Mesodermzellen von proximalen Bereichen in distale Bereiche der sich entwickelnden Extremität.

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel zu untersuchen, ob mit Hilfe der ^{3}H-Thymidin Markierung das Wanderungsverhalten embryonaler Mesodermzellen im Rahmen der Entwicklung von Extremitäten nachgewiesen werden kann. Darüberhinaus soll untersucht werden, ob die Zellvermehrung im Rahmen der Entwicklung der oberen Extremität in erster Linie durch lokale Zellproliferation oder aber durch Einwanderung von Zellen in die Extremität zustandekommt.

2.0. Material und Methoden

2.1. Tierstamm und Paarung

Als Versuchstiere wählten wir Albinomäuse vom Stamm NMRI, die unter optimaler Temperatur (25°C) und Luftfeuchtigkeit (50 - 60%) und unter einem verschobenen Tag-Nacht-Rhythmus (9°° - 21°° Uhr) gehalten wurden. Als Nahrung erhielten sie Altromin® Futter und Wasser ad libitum. Die Paarung erfolgte während der Dunkelheit zwischen 6°° Uhr und 8°° Uhr. Danach wurden die Tiere, bei denen sich ein Vaginalpfropf gebildet hatte, aussortiert und 8°° Uhr als Tag Null der Schwangerschaft festgesetzt.

2.2. Lichtmikroskopie

Miteinander verglichen werden sollten Embryonen des 9., 10. und 11. Entwicklungstages, die jeweils an dem entsprechenden Tag um 12°° Uhr, also zum Zeitpunkt 9 + 4, 10 + 4 usw. getötet und durch Sectio entnommen wurden.

Alle Embryonen fixierten wir in einer Mischung aus 3%igem Paraformaldehyd und 3%igem Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (pH 7,2). Anschließend erfolgte die Nachfixierung mit 1%igem Osmiumtetraoxid in Cacodylatpuffer (pH 7,2) und nach Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe dann die Einbettung in Mikropal® (Ferak). Nach dem Trimmen und Anspitzen bis zu der uns interessierenden Höhe des Abganges der oberen Extremität fertigten wir von den Präparaten 1 µ dicke Semidickschnitte an. Anschließend erfolgte die Färbung mit alkalischer Giemsalösung und die Eindeckung in Eukitt.

2.3. Autoradiographie

Pulsmarkierung:
Jeweils 3 Muttertieren wurde zum Zeitpunkt 9 + 3, 10 + 3, 11 + 3 der Schwangerschaft 5 mCi/kg Körpergewicht ^{3}H-Thymidin i.p. injiziert (spezifische Aktivität 5 Ci/mmol, Amersham). Eine Stunde später, zum Zeitpunkt 9 + 4, 10 + 4, und 11 + 4, wurden die Mäuse getötet, und die Embryonen durch Sectio entnommen.

Einer anderen Gruppe von je 3 Muttertieren wurde zu den oben angegebenen Zeitpunkten ebenfalls ^{3}H-Thymidin injiziert. Diese Tiere wurden jedoch erst jeweils 6 Stunden nach der Injektion getötet, d.h. zum Zeitpunkt 9 + 9, 10 + 9, 11 + 9, und die Embryonen entnommen.

Langzeitmarkierung:
Einer Gruppe von jeweils 6 Muttertieren wurde am Tag 8 + 3, 9 + 3 und 10 + 3 der Schwangerschaft 5 mCi/kg Körpergewicht ^{3}H-Thymidin i.p. injiziert, die Tiere jeweils 24 bzw. 30 Stunden nach Gabe von ^{3}H-Thymidin getötet, und die Embryonen entnommen.

Die Fixierung, Einbettung und das Anspitzen und Trimmen erfolgte wie unter 2.2. (Lichtmikroskopie) beschrieben. Es wurden Semidickschnitte von 1 µm Dicke angefertigt, die durch Dippen mit Ilford K5 Photoemulsion beschichtet und in einer lichtundurchlässigen Box bei 4°C aufbewahrt wurden. Nachdem sie in Amidol entwickelt und mit Natriumthiosulfat fixiert worden waren, erfolgte die Färbung mit alkalischer Giemsalösung und die Eindeckung in Eukitt.

3.0. Befunde

3.1. Tag 9

Lichtmikroskopie

Als erster Hinweis auf die beginnende Entstehung der vorderen Extremität ist in einigen Bereichen des parietalen Mesoderms eine Zellverdichtung von Mesodermzellen zu sehen. In diesen Arealen kommt es zu einer Ausstülpung des parietalen Mesoderms und damit zum Beginn der Entwicklung der Extremitätenknospe (Abb. 1 und 2). Im zentralen Bereich der Mesodermzellverdichtung befindet sich ein großes Gefäß. Weiter fallen hier Mitosen der Mesodermzellen auf, die nebeneinander liegen. In einigen Abschnitten der beginnenden Extremitätenentwicklung unterscheidet sich die Epidermis deutlich von der der übrigen embryonalen Bereiche: Die normalerweise flachen Epidermiszellen nehmen eine mehr kubische Gestalt an. Auf Höhe der zukünftigen Extremität ist eine Auswanderung von Zellen aus dem Somitenverband und damit eine beginnende Somitenauflösung erkennbar. Am ausgeprägtesten ist diese im Bereich des Sklerotoms. Die Mesodermzellen des Sklerotoms zeigen eine bevorzugte Ausrichtung auf die Chorda dorsalis zu. Im Gebiet des Myotoms und des lateral gelegenen Dermatoms sieht man dagegen einen noch relativ geschlossenen Zellverband.

Pulsmarkierung: 1 Stunde ^{3}H-Thymidin

Eine Stunde nach Gabe von ^{3}H-Thymidin ist in den embryonalen Bereichen in Höhe der Entstehung der vorderen Extremität allgemein eine deutliche Zellmarkierung erkennbar (Abb. 4). Das Markierungsmuster der Mesodermzellen der sich entwickelnden Extremität unterscheidet sich nicht von dem des sich auflösenden Sklerotoms und des übrigen paraxialen Mesoderms. In all den erwähnten Arealen liegen die markierten Mesodermzellen in Zellgruppen von etwa drei bis sechs Zellen nebeneinander. Weiter fällt auf, daß neben den markierten Interphasezellen nur vereinzelt markierte Mitosen von Mesodermzellen zu sehen sind. Besonders ausgeprägt zeigt sich auch die Markierung im Bereich des Rückenmarks (Abb. 3), während die neben dem Rückenmark liegenden Zellen des paraxialen Mesoderms nur teilweise markiert sind. In den lateralen Anteilen der Somiten, die sicher dem Dermatom zuzuordnen sind, weist die Mehrzahl der Zellen eine deutliche Mar-

kierung auf. In dem medial davon gelegenen Myotom sind dagegen nur vereinzelt markierte Zellen zu erkennen.

6 Stunden

Sechs Stunden nach Gabe von ^{3}H-Thymidin hat sich das Markierungsmuster der Strukturen im Bereich der Entstehung der vorderen Extremität nicht merklich geändert. Weder im Gebiet der sich entwickelnden Extremität noch in dem der Somiten ist eine Verschiebung des Markierungsmusters erkennbar, die auf eine Wanderung in dieses bzw. aus diesem Areal schließen läßt. Einziger Unterschied im Vergleich zur einstündigen ^{3}H-Thymidin Markierung ist eine deutliche Zunahme markierter Mitosen.

24 Stunden

Nach ^{3}H-Thymidin Gabe am Tag 8, d.h. vor der Extremitätenentstehung, ist 24 Stunden später nur eine allgemeine diffuse Markierung zu erkennen. Eine Anordnung in Klonen, wie sie nach 6-stündiger ^{3}H-Thymidin Markierung zu sehen war, ist nach 24-stündiger Markierung nicht mehr nachweisbar.

30 Stunden

Wie schon nach 24 Stunden, ist auch 30 Stunden nach Gabe von ^{3}H-Thymidin die Markierung nur diffus. Allerdings übersteigt die Markierung der Mesodermzellen deutlich den autoradiographischen Background, ist jedoch allgemein so gering, daß in keinem Bereich der sich entwickelnden Extremität deutlich abzugrenzende Markierungszonen erkennbar sind.

3.2. Tag 10

Lichtmikroskopie

Am Tag 10 der Entwicklung hat sich die Extremitätenknospe deutlich vergrößert (Abb. 5). Sie besteht zu diesem Zeitpunkt aus undifferenzierten Mesodermzellen, die mehr oder minder dicht gepackt aneinanderliegen. Dabei entsteht generell der Eindruck, daß die Mesodermzellen in der Peripherie der Extremität dichter gepackt sind als die in den proximalen Anteilen. Die äußere Begrenzung der Extremität wird von der Epidermis gebildet,

die sich im Vergleich zu Tag 9 der Entwicklung deutlich verdickt hat. Besonders auf der ventralen Seite besteht die Epidermis jetzt schon aus zwei bis drei Zellagen. Im dorsalen Anteil der Epidermis der Extremität sind vereinzelt auch Bereiche vorhanden, in denen sich die Epidermis im Vergleich zu Tag 9 nicht verändert hat. Sie besteht nach wie vor aus einer Zellage flacher Epithelzellen. An der Spitze der Extremität hat sich die AER - Apical Ectodermal Ridge - gebildet. Im Bereich dieser AER besteht die Epidermis aus kubischen bis zylindrischen Epithelzellen, die in bis zu fünf Zellagen übereinanderliegen. Im distalen Bereich der Extremität, unterhalb des Gebietes der AER sind zwischen den verdichteten Mesodermzellen zahlreiche kleine Gefäße zu erkennen. Im paraxialen Bereich in Höhe der oberen Extremität haben sich die Spinalganglien gebildet, von denen Axone in Richtung auf die vordere Extremität zulaufen.

Das Dermatom und Myotom dieses Bereiches liegen noch in einer weitgehend geschlossenen Anordnung im Somitenverband. Die Zellen des Sklerotoms dagegen zeigen eine deutliche Ausrichtung der Zellen auf die Chorda zu.

Pulsmarkierung: 1 Stunde ^{3}H-Thymidin

Nach 1-stündiger Markierung mit ^{3}H-Thymidin ist im gesamten Bereich der sich entwickelnden Extremität eine starke Zellmarkierung vorhanden (Abb. 6). Auch hier ist auffallend, daß sowohl die markierten Zellen als auch die, die sich in der Mitosephase befinden, in Zellklonen angeordnet sind (Abb. 7). Wie schon am Tag 9, so findet man auch jetzt vereinzelt markierte Mitosen, wobei der Eindruck entsteht, daß die Zahl markierter Mitosen im distalen Bereich der Extremität größer ist als im proximalen. Sowohl im Areal der AER als auch in den übrigen Anteilen der Epidermis sind markierte Epithelzellen sichtbar. In den Bereichen, in denen die Epidermis aus mehreren Zellagen besteht, sind sowohl in der Basalzellschicht als auch in der darüberliegenden markierte Zellen vorhanden, die wiederum vorwiegend in Zellgruppen nebeneinanderliegen (Abb. 7).

Im Gebiet der Somiten in Höhe des Abganges der vorderen Extremität sind die Dermatomzellen zu einem überwiegenden Teil markiert. Ganz im Gegensatz dazu sind im Myotom so gut wie keine markierten Zellen erkennbar. Die schon in Richtung auf die Chorda aus dem Somitenverband ausgetretenen Sklerotomzellen zeigen - wie schon am Tag 9 - eine Anhäufung von markierten Zellen in Klonen.

6 Stunden

Sechs Stunden nach Gabe von ^{3}H-Thymidin hat sich das Markierungsmuster weder der mesodermalen noch der epidermalen Anteile der Extremität geändert. Die markierten Mesodermzellen im Bereich der vorderen Extremität liegen nach wie vor in Klonen angeordnet zusammen (Abb. 8).

24 bzw. 30 Stunden

Selbst nach 24 bzw. 30 Stunden gibt es keine Hinweise, die auf eine Wanderung von Mesodermzellen der vorderen Extremität, bzw. in sie hinein, schließen lassen. Nach wie vor liegen die markierten Mesodermzellen in Zellhaufen nebeneinander. Allerdings ist - im Vergleich zu den kurzzeitigen Markierungen - die Zellmarkierung deutlich geringer. Auch innerhalb der verschiedenen Anteile der Epidermis sind weder nach 24- noch nach 30-stündiger ^{3}H-Thymidin Markierung Unterschiede im Markierungsverhalten gegenüber den frühen Tagen erkennbar.

3.3. Tag 11

Lichtmikroskopie

Am Tag 11 ist die weitere Entwicklung der vorderen Extremität schon deutlich fortgeschritten. Neben einem allgemeinen Wachstum der Extremität fällt auf, daß die Mesodermzellen nicht mehr relativ homogen verteilt sind, sondern daß sowohl im proximalen als auch im distalen Bereich der Extremität unterschiedliche Verdichtungszonen erkennbar sind (Abb. 9). Distal liegt eine dieser Verdichtungszonen direkt unterhalb des Gebietes der AER, das sog. Subridge Mesoderm. Im Gegensatz dazu erscheint das Zentrum der Extremität aufgelockert. Im proximalen Teil der Extremität sieht man eine größere ventral gelegene Verdichtungszone. Dorsal vom Bereich des Eintritts der Axone in die Extremität ist zwischen Axon und Epidermis ebenfalls eine Verdichtungszone von Mesodermzellen zu erkennen (Abb. 10).

Die Zahl der Gefäße innerhalb der vorderen Extremität hat insgesamt merklich zugenommen: In der Nähe der Spitze hat sich der venöse Randsinus angefangen zu bilden. Darüberhinaus sind auch in zentralen Anteilen der proximalen und distalen Gebiete zahlreiche Gefäße sichtbar.

Pulsmarkierung:

Eine Stunde nach Gabe von ^{3}H-Thymidin entspricht das Markierungsmuster dem am Tag 10 der Pulsmarkierung: Wiederum sind zahlreiche Mesodermzellen markiert, die in Zellgruppen zusammen angeordnet liegen (Abb. 13 und 15).

Der einzige Bereich der Extremität, dessen Markierungsmuster sich gegenüber Tag 10 deutlich verändert hat, ist die Verdichtungszone im ventralen Bereich der proximalen Extremität (Abb. 11 und 12). Hier sieht man eine relativ starke homogene Markierung der Mesodermzellen. Die Verdichtungszone der Mesodermzellen dorsal des in die Extremität einsprossenden Axons zeigt nur eine sehr geringe Markierung. Allerdings weisen zahlreiche Mitosen darauf hin, daß auch in diesem Bereich eine starke Zellvermehrung stattfindet.

24 und 30 Stunden

24 bzw. 30 Stunden nach Gabe von ^{3}H-Thymidin am Tag 11 sind keine Hinweise auf ein Wanderungsverhalten der Mesodermzellen nachweisbar (Vergleiche Abb. 13 mit 14 bzw. Abb. 15 mit 16). Nach wie vor sind die markierten Mesodermzellen in Klonen angeordnet. Allerdings liegen die markierten Zellen der unterschiedlichen Bereiche verschieden dicht gepackt nebeneinander, so daß der Eindruck entsteht, in den Verdichtungszonen seien mehr markierte Zellen als in den locker angeordneten Anteilen. Der einzige Bereich der Extremität, der sich durch eine besonders große Anzahl von markierten Mesodermzellen auszeichnet, ist im Zentrum der proximalen Extremität erkennbar. In den dorsalen und ventralen Verdichtungszonen der proximalen Bereiche der Extremität ist auch nach 24- bzw. 30-stündiger Thymidingabe nur eine geringe Zellmarkierung zu erkennen.

4.0. Diskussion:

Wie schon in der Einleitung erwähnt, beruhen die Kenntnisse über die Frühphasen der embryonalen Entwicklung der Extremitäten überwiegend auf an Hühnerembryonen erhobenen Befunden. Obwohl es offensichtlich ist, daß sich der aus einer Extremitätenanlage entwickelnde Hühnerflügel z.B. von der sich aus einer Extremitätenanlage entwickelnden oberen Extremität des Menschen wesentlich unterscheidet, muß man - aus Mangel über an Säugetieren erhobenen Befunden, für das Verständnis der embryonalen Entwicklung der menschlichen Extremität - auf an Hühnerembryonen erhobenen Befunde zurückgreifen. Alle grundlegenden Erkenntnisse über das Proliferations- und Migrationsverhalten von Mesodermzellen im Rahmen der Extremitätenentwicklung beruhen z.B. auf an Hühnerembryonen gewonnenen Ergebnissen (SEARLS, 1967; STARK und SEARLS, 1973; LEWIS, 1977). Ebenso hat der z.Zt. gültige Stand der Kenntnis über die Rolle des Dermatoms der Somiten an der Entwicklung der quergestreiften Extremitätenmuskulatur Experimente zur Grundlage, die an Hühnerembryonen durchgeführt wurden (WACHTLER et al., 1981, 1982).

Es ist unbestritten, daß besonders für die experimentelle Embryologie aus zahlreichen technischen bzw. methodischen Gründen Hühnerembryonen als Untersuchungsobjekt besonders gut geeignet sind. Dennoch erscheint es uns zur Klärung der Frage, inwieweit die an Hühnerembryonen gesicherten Erkenntnisse über die Extremitätenentwicklung auf die Säugetierentwicklung übertragen werden können, unerläßlich, wenigstens den Versuch zu machen, auch an Säugetieren Ergebnisse über das Proliferations- und Migrationsverhalten von Mesodermzellen in der Frühphase der Extremitätenentwicklung zu gewinnen.

In diesem Rahmen sollte die vorliegende Untersuchung dazu dienen, durch den Einsatz autoradiographischer Methoden Informationen über das Proliferations- und Migrationsverhalten der an der Extremitätenentwicklung der Maus beteiligten Mesodermzellen zu erhalten. Methodische Grundlage unserer Untersuchungen war die Ermittlung der Zellkinetik der Mesodermzellen mit Hilfe der ^{3}H-Thymidin-Pulsmarkierung (QUASTLER und SHERMAN, 1959). Appliziertes ^{3}H-Thymidin wird sehr rasch in die DNS aller proliferierenden Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, eingebaut. Untersucht man die Tiere dann kurze Zeit nach der ^{3}H-Thymidingabe autoradiographisch, in unserem Fall nach 60 Minuten, läßt sich an-

hand der Menge markierter Zellen in dem jeweiligen Gewebe feststellen, in welchen Bereichen eine starke Zellproliferation stattgefunden hat. Diese sog. Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin diente uns dazu, das Proliferationsverhalten der Mesodermzellen während der Extremitätenentwicklung zu verfolgen. Selbst wenn man die Tiere nach einmaliger ^{3}H-Thymidingabe weiterleben läßt, ist gesichert, daß die Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, nur einmal über einen Zeitraum von 10 - 20 Minuten markiert werden können. Das den schwangeren Tieren applizierte ^{3}H-Thymidin, das nicht in die DNS eingebaut wird, wird schon nach 10 - 20 Minuten in der mütterlichen Leber zu Thymin und ^{3}H-markiertem Wasser umgebaut, so daß es danach nicht mehr für den Einbau in die DNS zur Verfügung steht (SCHULTZE, 1968). Eine weitere Zellmarkierung proliferierender Zellen ist nach diesem Zeitraum nur noch dadurch möglich, daß in der Mitose einer markierten Zelle die Markierung auf die beiden entstehenden Tochterzellen verteilt wird. Wandern so markierte Zellen im Verlauf der weiteren Entwicklung eines Gewebes in eine bestimmte Richtung, ist zu erwarten, daß sich dementsprechend die Verteilung der markierten Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Markierung, d.h. vom Zeitpunkt der ^{3}H-Thymidinapplikation, im Gewebe verschiebt. Durch die Untersuchung der Änderungen des Markierungsmusters 6, 24 und 30 Stunden nach Gabe von ^{3}H-Thymidin erhofften wir somit, Informationen über das Wanderungsverhalten der Mesodermzellen im Verlauf der Extremitätenentwicklung zu erhalten.

Bei der Planung der vorliegenden Untersuchung gingen wir als Denkansatz von zwei zellkinetischen Extremen aus, durch die das Wachstum der sich entwickelnden Extremität vor sich gehen könnte. Eine Möglichkeit wäre die, daß sich Zellen im Bereich des parietalen und möglicherweise auch des paraxialen Mesoderms vermehren, um von dort aus in die sich entwickelnde Extremität zu wandern. In diesem Fall wäre aufgrund unserer Versuchsanordnung folgendes Markierungsmuster zu erwarten:
Bei der Pulsmarkierung mit ^{3}H-Thymidin müßte es zu einer starken Markierung im parietalen bzw. paraxialen Mesoderm kommen, während in der entstehenden Extremität kaum markierte Zellen nachweisbar sein dürften. 6, 24 und 30 Stunden später müßte sich der ursprünglich im Stamm liegende Markierungsbereich immer mehr in die Extremität hinein verlagern. Während eine Stunde nach ^{3}H-Thymidingabe in der Extremität kaum markierte Zellen nachweisbar sein dürften, müßten nach 24 und 30 Stunden zahlreiche markierte Zellen in die Extremität eingewandert sein. Die Zell-

kinetik der Mesodermzellen wäre in diesem Fall also durch eine starke Zellvermehrung im Stamm mit darauffolgender ausgeprägter Wanderung dieser Zellen in die Extremität hinein gekennzeichnet.

Die zweite Möglichkeit, durch die sich das Zellmaterial im Rahmen der Extremitätenentwicklung vermehren könnte, wäre die, daß die Zellen nicht von proximal in die Extremität einwandern, sondern daß es in den Bereichen, in denen die Extremität wächst, zu einer lokalen Zellproliferation kommt. In diesem Fall müßte das Markierungsmuster wie folgt aussehen: Eine Stunde nach der ^{3}H-Thymidinmarkierung müßte es in den Wachstumszonen der Extremität zu einer starken Markierung von Zellen kommen. Wenn diese markierten Zellen dann weitgehend an ihrem Entstehungsort blieben und nur wenige Zellen im Rahmen des weiteren Wachstums in andere Bereiche wanderten, um sich dann dort später zu vermehren, dürfte sich das Markierungsmuster innerhalb der Extremität nach 6, 24 und 30 Stunden so gut wie nicht verändern. In diesem Fall würde die Zellkinetik der Mesodermzellen in erster Linie durch eine lokale Zellproliferation im Bereich der sich entwickelnden Extremität geprägt sein, während eine Wanderung von Mesodermzellen für das Extremitätenwachstum von untergeordneter Bedeutung wäre.

Wie unsere Untersuchung zeigte, kann noch ein weiteres Markierungsmuster oder genauer gesagt das Fehlen einer Markierung vorkommen, aus dem sich Schlüsse über die Zellkinetik der Mesodermzellen ziehen lassen. Wie schon erwähnt, übertragen die durch ^{3}H-Thymidin markierten Mesodermzellen in jeder Mitose die markierte DNS auf zwei Tochterzellen. Dadurch vermindert sich nach jeder Zellteilung die Markierungsintensität der Zelle. Haben sich die markierten Zellen innerhalb des Untersuchungszeitraums von 24 , 30 Stunden sehr oft geteilt, führt das dazu, daß nach diesem Zeitraum in dem ursprünglich markierten Bereich der Extremität nur noch eine sehr geringe Markierung nachweisbar ist. Die starke Abnahme der Markierung 24 bzw. 30 Stunden nach der ^{3}H-Thymidin Gabe ist dann ein indirekter Hinweis auf starke Proliferationsaktivitäten in diesem Bereich.

Die Untersuchung wurde am Tag 9 der Embryonalentwicklung begonnen, weil zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung der oberen Extremität mit der Verdickung des parietalen Mesoderms im Brustbereich unterhalb der Herzanlage beginnt (JURAND, 1965; MILAIRE, 1965). Die Pulsmarkierung am Tag 9 zeigte, daß das Mesoderm im Bereich der Extremitätenentstehung zu

diesem Zeitpunkt stark proliferiert. Zusammen mit dem Vorkommen von Mitosen in diesem Bereich weist die starke Markierung nach ^{3}H-Thymidingabe eindeutig darauf hin, daß das Zellmaterial für die beginnende Ausstülpung der Extremität durch eine starke Zellvermehrung in diesem Bereich zustandekommt.

Es fällt auf, daß die markierten Zellen in der sich entwickelnden Extremitätenknospe nicht diffus verteilt sind, sondern sozusagen in Markierungsklonen auftreten. Es wäre vorstellbar, daß diese Klone markierter Zellen dadurch entstanden sind, daß gewisse, für die Extremitätenentstehung verantwortliche Stammzellen plötzlich etwa gleichzeitig mit der Proliferation beginnen.

In den 9 Tage alten Embryonen, die 24 bzw. 30 Stunden vorher, d.h. am Tag 8, durch ^{3}H-Thymidingabe markiert wurden, ließ sich im Bereich der entstehenden Extremität nur noch eine sehr diffuse Markierung nachweisen. In keinem Bereich des paraxialen bzw. parietalen Mesoderms waren nach diesem Zeitraum noch stark markierte Mesodermzellen erkennbar. Das spricht, wie schon erwähnt, dafür, daß es zwischen Tag 8 und 9 allgemein zu einer starken Proliferation des Mesoderms kommt, die es leider unmöglich macht, anhand der Veränderungen des Markierungsmusters nach ^{3}H-Thymidingabe Aussagen über das Migrationsverhalten von Mesodermzellen während dieser Frühphase der Extremitätenentwicklung zu erhalten.

Nach Pulmarkierung am Tag 10 sind in der gesamten Extremität zahlreiche markierte Mesodermzellen erkennbar. In keinem Bereich der Extremität ist die Zahl markierter Zellen im Vergleich zu den übrigen Anteilen der Extremität so stark, daß man vom Vorhandensein von Proliferationszentren oder von Wachstumszonen sprechen kann. Allerdings fällt, wie schon am Tag 9, auf, daß die markierten Mesodermzellen überwiegend in kleinen Gruppen angeordnet in der Extremität vorkommen. Interessant erscheint uns der Befund, daß sich am Tag 10 das Markierungsmuster in der Extremität eine, bzw. 6 Stunden nach ^{3}H-Thymidingabe weder proximal noch distal auffallend von dem Markierungsmuster in den Extremitäten der Embryonen unterscheidet, die 24 bzw. 30 Stunden vorher markiert worden waren. Es ist zu diskutieren, welches Proliferations- und Migrationsverhalten der Mesodermzellen zwischen Tag 9 und 10 diese, unter allen von uns gewählten Markierungsbedingungen relativ gleichmäßige Verteilung der Markierung innerhalb der Extremität verursacht haben könnte.

Wie schon erwähnt, wies die Pulsmarkierung am Tag 9 auf eine starke Markierung und damit auf eine starke Proliferation im Bereich der gerade entstehenden Extremität hin. Wäre das weitere Wachstum der Extremität zwischen Tag 9 und 10 nun in erster Linie dadurch verursacht worden, daß diese sozusagen 1. Extremitätenzellgeneration am Tag 10 die distale Extremität gebildet hätte, während sich das Zellmaterial der proximalen Extremität aus durch starke Proliferation im Bereich des parietalen Mesoderms entstandenen Zellen rekrutiert hätte, so hätte die Intensität der Zellmarkierung in der distalen Extremität sehr viel stärker sein müssen als in der proximalen Extremität. Die durch starke Proliferation im proximalen Bereich sozusagen in die Peripherie geschobene distale 1. Extremitätenzellgeneration hätte sich in sehr viel geringerem Maße vermehren müssen als die proximalen Zellen, und ihre ursprünglich vorhandene Markierung wäre nicht so stark durch ständige Proliferation verdünnt worden, wie das bei den proximalen Zellen der Fall gewesen wäre.

Tatsächlich ist 24 bzw. 30 Stunden nach Markierung sowohl die Verteilung markierter Zellen wie auch die Intensität der Markierung am Tag 10 in der proximalen und distalen Extremität sehr ähnlich. Das spricht unserer Meinung nach dafür, daß die Zellen, die am Tag 10 die gesamte Extremität bilden, weitgehend aus den Zellen entstanden sind, die schon 24 bzw. 30 Stunden vorher, d.h. am Tag 9, im Bereich der gerade entstehenden Extremität vorhanden waren und markiert wurden.

Anhand unserer Versuchsanordnung kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, daß neben diesen aus dem parietalen Mesoderm entstandenen primären Extremitätenzellen noch weitere Zellen an der Extremitätenentwicklung beteiligt sind. Mit der von uns angewandten autoradiographischen Untersuchung und des davon abhängigen Verlaufs des Markierungsmusters läßt sich nur das Proliferations- und Migratonsverhalten sehr großer Mesodermzellpopulationen mit einer gewissen Genaugikeit erfassen. Das Verhalten kleinerer Subpopulationen, deren Zellkinetik sich möglicherweise von der Masse der Mesodermzellen völlig unterscheidet, kann auf diese Weise nicht erfaßt werden, da ihre Zellkinetik sozusagen in der Masse der Mesodermzellen untergeht.

Gerade die Frage der Beteiligung des Dermatoms an der Extremitätenentwicklung des Säugetiers hätten wir in unserer Untersuchung gerne beantwortet. Die Ausrichtung der Dermatomzellen in Richtung auf die Extremi-

tät hin läßt am Tag 10 der Entwicklung den Eindruck entstehen, daß diese Zellen in die Extremität einwandern. Da diese Zellen, wenn sie den Dermatomzellverband verlassen haben, sich von den übrigen Mesodermzellen nicht mehr unterscheiden, ließ sich in unserer Untersuchung nicht verfolgen, wohin die Zellen wandern.

Während das Markierungsmuster der Mesodermzellen der sich entwickelnden Extremität am Tag 9 und 10 durch eine relativ diffuse, überwiegend in Klonen angeordnete Markierung von Mesodermzellen geprägt ist, werden am Tag 11 in der Extremität regional unterschiedliche Anordnungen der Markierung deutlich. Bei der Pulsmarkierung fällt eine Verdichtungszone von zahlreichen markierten Mesodermzellen auf der ventralen Seite der proximalen Extremität auf. In Embryonen, die 24 bzw. 30 Stunden vorher ^{3}H-Thymidin erhielten, ist diese Verdichtungszone dagegen kaum markiert. Das spricht eindeutig dafür, daß diese Verdichtungszone durch eine kurzfristige Proliferation von Mesodermzellen dieses Bereichs am Tag 11 und nicht durch Migration von Zellen, die sich vorher in einem anderen Bereich des Embryos vermehrt haben, entstanden ist.

Über die prospektive Bedeutung dieser Verdichtungszone für die weitere Entwicklung der Extremität liegen keine gesicherten Erkenntnisse vor. Es kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei dieser Verdichtungszone um ein Blastem handelt, aus dem sich später eine knorpelige Skelettanlage entwickelt. Zum einen spricht die Lage dieser Verdichtungszone am ventralen Rand der proximalen Extremität gegen diese Vorstellung, zum anderen unterscheidet sich das Markierungsverhalten dieses Bereichs deutlich vom Markierungsverhalten der Blasteme. Während die zum Blastem verdichteten Mesodermzellen bei einer ^{3}H-Thymidin-Pulsmarkierung nicht markiert werden, sondern nur durch Gabe von ^{3}H-Thymidin eine gewisse Zeit vor der Verdichtung eine Blastemmarkierung erreicht werden kann (HERKEN, 1975; 1980), ist das Markierungsverhalten dieser Verdichtungszone, wie eben beschrieben, genau umgekehrt. Vorstellbar wäre, daß diese ventrale Verdichtungszone für die Rotationsvorgänge im Rahmen der dreidimensionalen Ausrichtung der sich entwickelnden Extremität von Bedeutung ist.

Gegenüber der ventralen Verdichtungszone, d.h. im dorsalen Anteil der proximalen Extremität, ist am Tag 11 ebenfalls eine Verdichtung von Mesodermzellen nachweisbar. Im Gegensatz zur ventralen Verdichtungszone sind die Mesodermzellen weder nach Pulsmarkierung noch nach Langzeitmar-

kierung deutlich markiert. Dieser Befund ist deshalb so schwer einzuordnen, weil gleichzeitig in diesem Gebiet zahlreiche Mitosen von Mesodermzellen sichtbar sind, die ein Indiz dafür sind, daß diese Zellen proliferieren. Eine Erklärung wäre die, daß die Mesodermzellen dieses Gebiets überwiegend nur bestimmte Teile ihres Zellzyklus, wie z.B. die Mitose und möglicherweise auch die G_2-Phase, in diesem Areal vollziehen, während z.B. gerade die S-Phase, in der die Zellen markiert werden, und möglicherweise auch die G_1-Phase in anderen Bereichen der Extremität stattfinden. Das Verhalten der Zellen dieser dorsalen Verdichtungszone ähnelt dabei dem Markierungsmuster in den Somiten. Auch in den Somiten ist nach Pulsmarkierung nur im Dermatombereich eine deutliche Zellmarkierung nachweisbar, während im danebenliegenden Myotom zwar Mitosen, aber so gut wie keine markierten Zellen vorhanden sind. Die Tatsache, daß diese beiden Zellagen der Somiten besonders in ihren Seitenbereichen z.T. schwer voneinander abzugrenzen sind, könnte ein Hinweis dafür sein, daß beide Bereiche eine funktionelle Einheit darstellen. Einige Autoren tragen dem Rechnung, in dem sie dieses Areal der Somiten als Dermatomyotom bezeichnen. Die Ähnlichkeit des Markierungsverhaltens der Zellen im Dermatomyotombereich der Somiten mit dem der Zellen in der dorsalen Verdichtungszone könnte ein Hinweis dafür sein, daß es sich bei diesen Zellen der dorsalen Verdichtungszone um aus den Somiten stammende myogene Stammzellen handelt, die später die Skelettmuskulatur bilden.

Bei der am Tag 11 im Zentrum der Extremität entstandenen Verdichtungszone handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um das Blastem, aus dem sich die Knorpelanlage des Humerus entwickelt. Nach ^{3}H-Thymidinmarkierung 24 bzw. 30 Stunden vorher sind diese Zellen dieses Blastems überwiegend markiert. Das läßt den Schluß zu, daß dieses Blastem aus Zellen gebildet wird, die am Tag 10 stark proliferierten und sich seitdem kaum noch geteilt haben. Wie zu erwarten, ist nach Pulsmarkierung am Tag 11 dieses Blastem nicht markiert. Da die Mesodermzellen, die sich zum Blastem verdichten, bis zum Zeitpunkt ihrer Differenzierung zu Knorpelzellen wahrscheinlich in der G_1-Phase des Zellzyklus arretiert sind (HERKEN, 1980), lassen sich diese Zellen durch ^{3}H-Thymidingabe nicht markieren.

Zusammenfassend stellen wir uns anhand der von uns erhobenen Befunde das Verhalten des Mesoderms im Rahmen der Frühentwicklung der oberen Extremität der Maus wie folgt vor:

Am Tag 9 der Embryonalentwicklung kommt es im parietalen Mesoderm, d.h. in der Somatopleura, zu einer starken Proliferation bestimmter, für die Extremitätenentwicklung verantwortlicher mesodermaler Stammzellen. Die Zellvermehrung in diesem Bereich führt zur Ausbuchtung der Epidermis und damit zur Entstehung der Extremitätenknospe. Durch weitere Vermehrung der in der Extremitätenknospe liegenden Mesodermzellen wird die Extremität dann im Verlauf der Entwicklung größer. Lokale Faktoren innerhalb der Extremität steuern dabei möglicherweise das Längenwachstum und die Ausrichtung der Extremität, indem sie bestimmte Zellklone zur Proliferation anregen und andere Zellklone ruhen lassen. Bis zum Tag 10 der Entwicklung besteht die Extremität sicher zumindest zum überwiegenden Teil aus ursprünglich im parietalen Mesoderm gelegenen Extremitäten-Stammzellen, die sich innerhalb der Extremität vermehrt haben. Für eine Einwanderung von Mesodermzellen aus dem Embryo in die Extremität hinein ergab unsere Untersuchung zu diesem Zeitpunkt keine Hinweise. Erst am Tag 11 der Entwicklung kommt es im Rahmen der Differenzierungsschritte innerhalb der Extremität wahrscheinlich auch zum Einwandern von myogenen Stammzellen aus den Somiten in die Extremität. Dieses Einwandern von Somitenzellen in die Extremität hinein trifft dabei zeitlich in etwa mit dem ersten Auftreten eines Blastems im Zentrum der Extremität und dem ersten Einsprossen von Axonen in die Extremität hinein zusammen.

5.0. Zusammenfassung

An Mäuseembryonen der Entwicklungstage 9 bis 11 wurde die Entstehung der vorderen Extremität lichtmikroskopisch und autoradiographisch mit Hilfe der ^{3}H-Thymidinmarkierung verfolgt. Die Arbeit sollte klären, ob die Mesodermzellen, die später die vordere Extremität bilden, von anderen Bereichen des Embryos kommend, in die Extremität hineinwandern oder ob sie an Ort und Stelle proliferieren.

Es zeigte sich, daß am Tag 9 die Entwicklung der vorderen Extremität mit einer Verdichtung des parietalen Mesoderms beginnt. Nach der Pulsmarkierung sieht man eine deutliche Markierung dieses Bereichs, wobei aber weder ein bestimmtes Muster, noch Unterschiede zwischen der Extremität, dem paraxialen Mesoderm und dem sich auflösenden Sklerotom zu erkennen sind. Festzuhalten ist, daß die markierten Zellen in Gruppen von drei bis zu sechs Zellen nebeneinander liegen. Während im Bereich der Somiten das Dermatom deutlich markiert ist, weist das Myotom nur vereinzelt Markierungen auf. Dieser Befund gilt im wesentlichen bei allen diesbezüglich untersuchten Entwicklungstagen und Markierungszeiträumen. Auch 6 Stunden nach ^{3}H-Thymidinmarkierung ergibt sich keine Änderung des Markierungsmusters in der Extremität. Die 24 und 30 Stunden vorher markierten Embryonen zeigen nur eine diffuse Markierung am Tag 9.

Am Tag 10 ist die Extremitätenknospe entstanden, wobei die Mesodermzellen der Peripherie dichter gepackt erscheinen. Im Vergleich zum vorherigen Tag weist die Pulsmarkierung kaum Unterschiede auf; markierte Mitosen sind im distalen Teil der Extremität häufiger als im proximalen. Auch die langen Markierungszeiten liefern wiederum keinen Hinweis auf eine Migration von Zellen in die Extremität hinein.

Die Untersuchung am Tag 11 zeigt unterschiedliche Verdichtungszonen: Distal das sog. subridge mesoderm und proximal das Blastem, das wahrscheinlich der zukünftigen Knorpelanlage für den Humerus zuzuordnen ist. Lateral von den aus den Spinalganglien aussprossenden Axonen sieht man eine Verdichtungszone, die vom Myotom herstammen könnte. Die Pulsmarkierung läßt diese Zone nur als gering markiert erscheinen. Für alle unterschiedlichen am Tag 11 untersuchten Markierungszeiten gilt der Befund, daß die markierten Zellen in Gruppen angeordnet beieinander liegen. Aus den Befunden der vorliegenden Arbeit ist der Schluß zu ziehen, daß das

embryonale Wachstum der vorderen Extremität der Maus zwischen Tag 9 und 11 der Entwicklung sicher in erster Linie durch lokale Zellproliferation innerhalb der entstehenden Extremität bestimmt wird und, wenn überhaupt, nur zu einem geringen Teil durch in die Extremität einwanderndes Zellmaterial.

6.0. Literatur

Amprino, R., 1977, Morphogenetic interrelationship between ectoderm and mesoderm in chick embryo limb development, in: "Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis", (D.A. Ede, J.R. Hinchliffe and M. Balls, eds.), 3rd Symposium, Cambridge Univ. Press, pp. 245 - 256.

Chevallier, A., Sengel, P., 1973, Démonstration de l'origine somitique des côtes sternales chez les Oiseaux, Comptes rendus de l'Academie des Sci., (Paris), Series D, 276, 1491 - 1494.

Chevallier, A., Kieny, M., Mauger, A., 1976, Sur l'origine de la musculature de l'aile chez les Oiseaux, C.R. Acad. Sci., (Paris), Series D, 282, 309 - 311.

Chevallier, A., Kieny, M., Mauger, A., 1977, Limb-somite relationship: origin of the limb musculature, J. Embryol. exp. Morph., 41, 245 - 258.

Chevallier, A., Kieny, M., Mauger, A., Sengel, P., 1977b, Developmental fate of the somitic mesoderm in the chick embryo, in: "Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis", (D.A. Ede, J.R. Hinchliffe and M. Balls, eds.), 3rd Symposium, Cambridge Univ. Press, pp. 421 - 432.

Christ, B., Jacob, H.J., Jacob, M., 1974, Über den Ursprung der Flügelmuskulatur. Experimentelle Untersuchungen mit Wachtel- und Hühnerembryonen, Experientia, 30, 1446 - 1448.

Christ, B., Jacob, H.J., Jacob, M., 1977, Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos, Anat. Embryol., 150, 171 - 186.

Christ, B., Jacob, H.J., 1980, Origin, distribution and determination of chick limb mesenchymal cells, in: "Teratology of the Limbs", (H.-J. Merker, H. Nau and D. Neubert, eds.), Walter de Gruyter Verlag, Berlin - New York, pp. 67 - 77.

Christ, B., Jacob, H.J., Jacob, M., Wachtler, F., 1982, On the origin, distribution and determination of avian limb mesenchymal cells, Prog. Clin. Biol. Res., 110 Pt. B, 281 - 291.

Grim, M., 1970, Differentiation of myoblasts and the relationship between somites and the wing bud of the chick embryo, Z. Anat. Entwickl.-gesch., 132, 260 - 271.

Gumpel-Pinot, M., 1974, Contribution du mésoderme somitique à la genèse du membre chez l'embryon d'oiseau, C.R. Acad. Sci., (Paris), Series D, 279, 1305 - 1308.

Gumpel-Pinot, M., 1980, Limb chondrogenesis: Interactions between ectoderm and mesoderm, in: "Teratology of the Limbs", (H.-J. Merker, H. Nau and D. Neubert, eds.), Walter de Gruyter Verlag, Berlin - New York, pp. 43 - 50.

Herken, R., 1975, Autoradiographic investigations with ^{3}H-thymidine in limb cultures, in: "New Approaches to the Evaluation of Abnormal Embryonic Development", (D. Neubert and H.-J. Merker, eds.), Georg Thieme Publ., Stuttgart, pp. 200 - 212.

Herken, R., 1977, The influence of D-penicillamine on the proliferation rate of cells from the upper limb bud of mouse embryos in vitro, Teratology, 15, 159 - 162.

Herken, R., 1980, Proliferation behaviour and surface coat in the limb bud blastema of mouse embryos. An autoradiographic study, in: "Teratology of the Limbs", (H.-J. Merker, H. Nau and D. Neubert, eds.), Walter de Gruyter Verlag, Berlin - New York, pp. 163 - 170.

Jurand, A., 1965, Ultrastructural aspects of early development of the forelimb buds in the chick and the mouse, Proc. Roy. Soc. B., 162, 387 - 405.

Kieny, M., Mauger, A., Sengel, P., 1972, Early regionalization of the somitic mesoderm as studied by the development of the axial skeleton of the chick embryo, Dev. Biol., 28, 142 - 161.

Kochhar, D.M., 1977, Cellular basis of congenital limb deformities induced in mice by Vitamine A, Birth Defects: Original Article Series, Vol. XII, No. 1, pp. 111 - 154.

Langman, J., Nelson, G.R., 1968, A radioautographic study of the development of the somite in the chick embryo, J. Embryol. exp. Morph., 19, 217 - 226.

Lewis, J., 1977, Growth and determination of the developing limb, in: "Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis", (D.A. Ede, J.R. Hinchliffe and M. Balls, eds.), 3rd Symposium, Cambridge Univ. Press, pp. 215 - 228.

Mauger, A., Sengel, P., 1970, La ptéryle spinale de l'embryon de Poulet: territoire présomptif, arrangement et développement embryonnaire, Dev. Biol., 23, 609 - 633.

Mauger, A., 1970, Le développement du plumage dorsal de l'embryon de Poulet étudié à l'aide d'irradiations aux rayons X, Dev. Biol., 22, 412 - 432.

Mauger, A., 1972a, Rôle du mésoderme somitique dans le developpement du plumage dorsal chez l'embryon de Poulet. I. Origine, capacités de régulation et déterminisme du mésoderme plumigène, J. Embryol. exp. Morphol., 28, 313 - 341.

Mauger, A., 1972b, Rôle du mésoderme somitique dans le developpement du plumage dorsal chez l'embryon de Poulet. II. Régionalisation du mésoderme plumigène, J. Embryol. exp. Morphol., 28, 343 - 366.

Milaire, J., 1965, Aspects of limb morphogenesis in mammals, in: "Organogenesis" (R.L. De Haan and H. Ursprung, eds.), Holt, Rinehart and Winston, New York, pp. 283 - 300.

Otis, E.W., Brent, R.C., 1950, Equivalent ages in mouse and human embryos, Anat. Rec., 120, 33 - 64.

Pinot, M., 1970, Le rôle du mésoderme somitique dans la morphogenèse précoce des membres de l'embryon de Poulet, J. Embryol. exp. Morphol., 23, 109 - 151.

Quastler, H., Sherman, F.G., 1959, Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse, Exp. Cell Res., 17, 420 - 438.

Saunders, J.W., 1948, Do the somites contribute to the formation of the chick wing ? Anat. Rec., 100, 756.

Saunders, J.W., Jr., 1977, The experimental analysis of chick limb bud development, in: "Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis", (D.A. Ede, J.R. Hinchliffe and M. Balls, eds.), 3rd Symposium, Cambridge Univ. Press, pp. 1 - 24.

Schultze, B., 1968, Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm, in: "Handbuch der allg. Pathologie", (B. Schultze, Ed.), II/5, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.

Searls, R.L., 1967, The role of cell migration in the development of the embryonic chick limb bud, J. Exp. Zool., 166, 39 - 45.

Stark, R.J., Searls, R.L., 1973, A description of chick wing bud development and a model of limb morphogenesis, Dev. Biol., 33, 138 - 153.

Straus, W.L., Rawles, M.E., 1953, An experimental study of the origin of the trunk musculature and ribs in the chick, Am. J. Anat., 92, 471 - 509.

Streeter, G.L., 1942, Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI, 13 to 20 somites, and age group XII, 21 to 29 somites, Carnegie Contrib. to Embryol., 30, 211 - 245.

Theiler, K., 1972, "The House Mouse: Development and Normal Stages from Fertilization to 4 Weeks of Age", (K. Theiler, Ed.), Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.

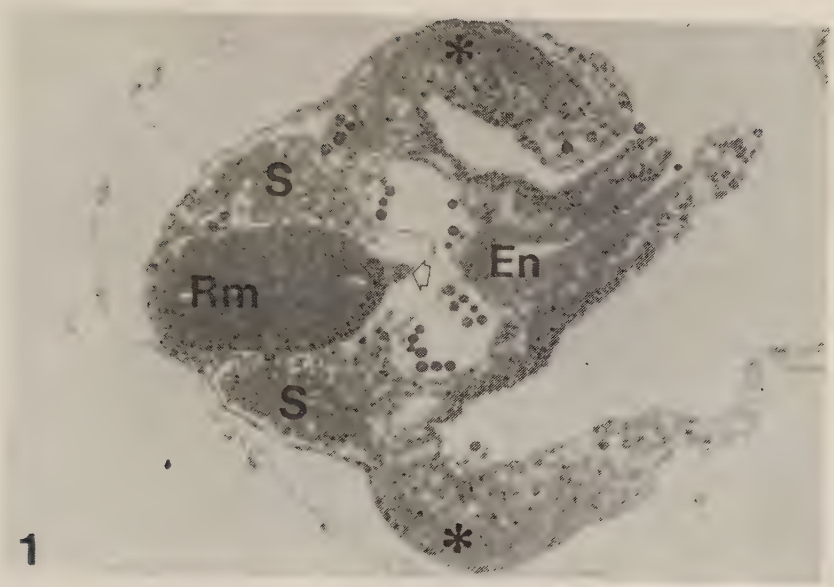
Wachtler, F., Christ, B., Jacob, H.J., 1981, On the determination of mesodermal tissues in avian embryonic wing bud, Anat. Embryol., 161/3, 283 - 290.

Wachtler, F., Christ, B., Jacob, H.J., 1982, Grafting experiments of determination and migratory behaviour of presomitic, somitic and somatopleural cells in avian embryos, Anat. Embryol., 164/3, 369 - 378.

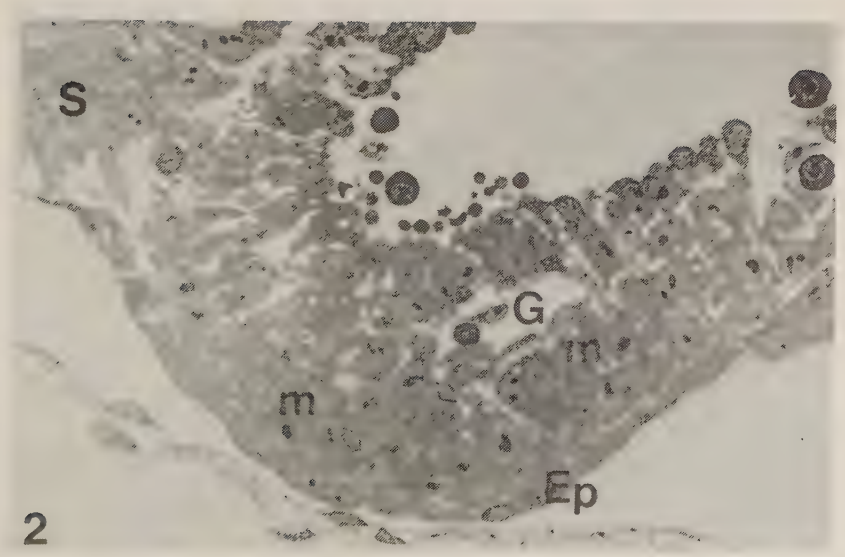
BILDANHANG

Abb. 1: Querschnitt durch 9 Tage alten Mäuseembryo in Höhe der sich entwickelnden vorderen Extremität.
Rm: Rückenmark
S : Somiten
***: Verdichtung des parietalen Mesoderms als Hinweis auf den Beginn der Extremitätenentwicklung
→ : Chorda dorsalis
En : Entodermrohr
Vergrößerung: 1:200

Abb. 2: Vergrößerung des Bereichs der sich entwickelnden vorderen Extremität von Abb. 1.
m : sich verdichtende Mesodermzellen
→ : Mitosen von Mesodermzellen
Ep: Epidermis
G : Gefäß
S : Somit, wahrscheinlich Myotom
Vergrößerung: 1:800



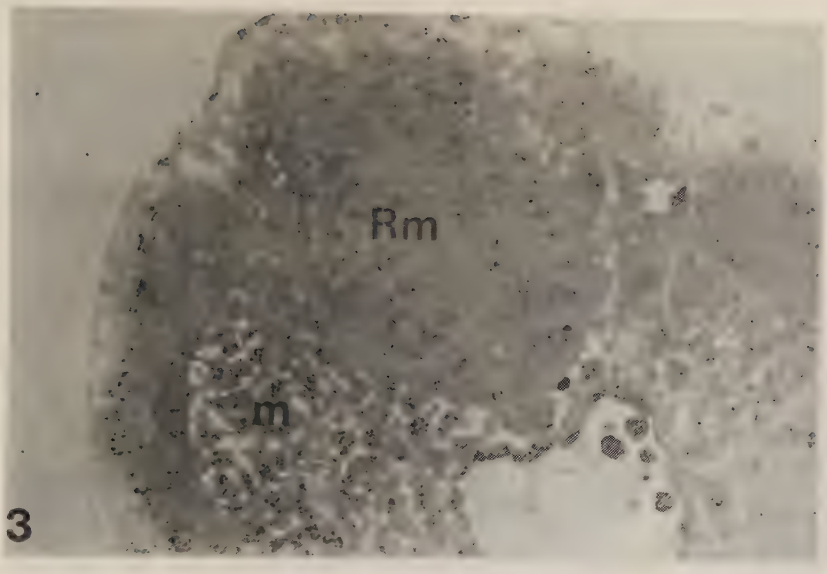
1



2

Abb. 3: Querschnitt durch einen 9 Tage alten Embryo in Höhe der sich entwickelnden vorderen Extremität 1 Stunde nach Markierung mit ^{3}H-Thymidin.
Rm : deutlich markiertes Rückenmark
m : paraxiales Mesoderm
Vergrößerung: 1:500

Abb. 4: Bereich der Extremitätenentstehung eines Mäuseembryos am Tag 9 nach 1-stündiger Markierung mit ^{3}H-Thymidin.
m : Mesodermzellen
* : in Gruppen angeordnete Mitosen
→ : kubisch bis zylindrisch geformte Epithelzellen
G : Gefäß
Vergrößerung: 1:800


Rm
m
3

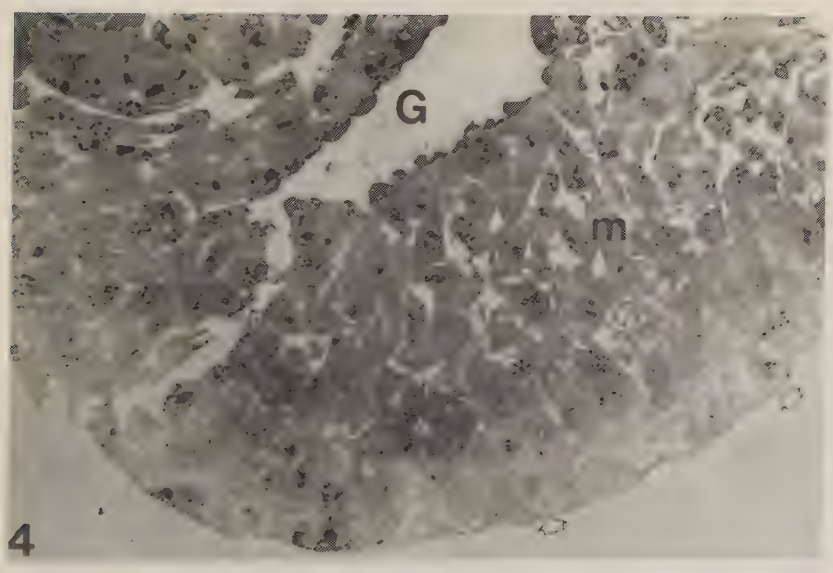
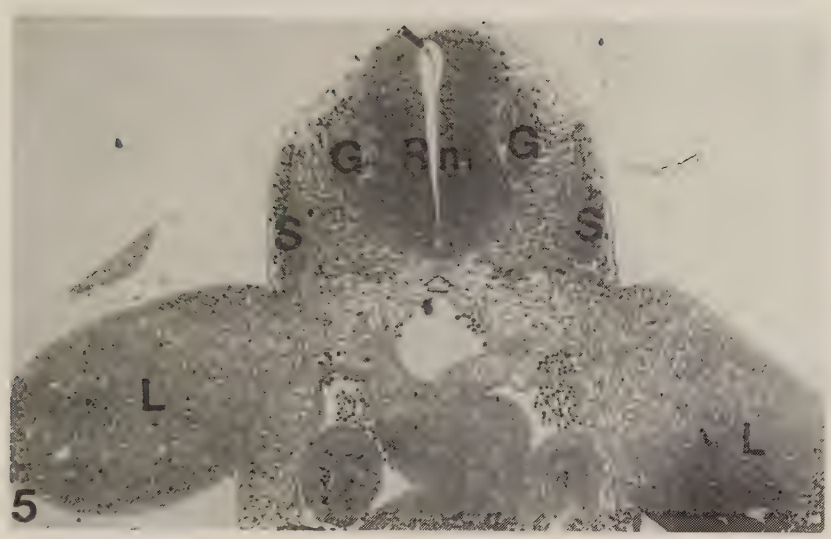
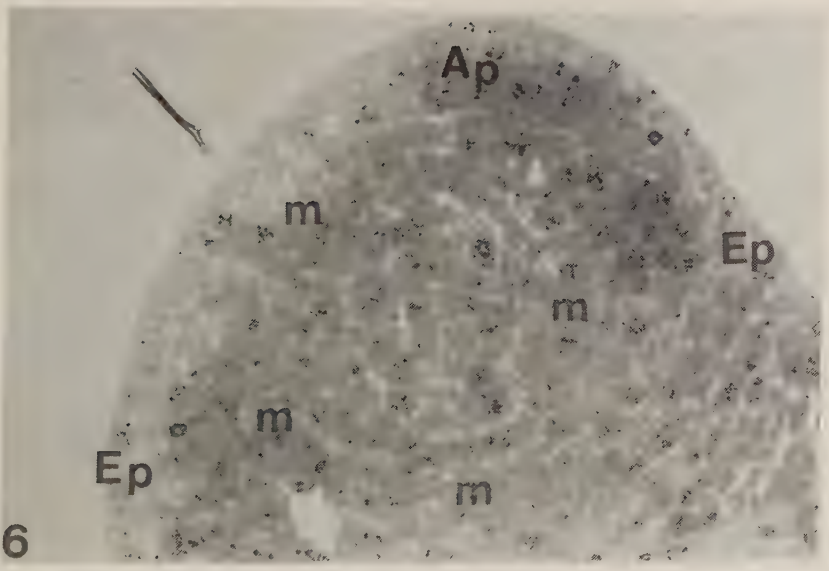

G
m
4

Abb. 5: Querschnitt durch einen 10 Tage alten Embryo in Höhe der sich entwickelnden vorderen Extremitäten.
Rm : Rückenmark
G : Spinalganglien
S : Somiten
→ : Chorda
L : Extremität
Vergrößerung: 1:100

Abb. 6: Distaler Bereich der vorderen Extremität am Tag 10 1 Stunde nach Markierung mit ^{3}H-Thymidin.
Ap : Apical ridge
Ep : Markierung im Bereich der Epidermis
m : Markierung im Bereich der Mesodermzellen
Vergrößerung: 1:500



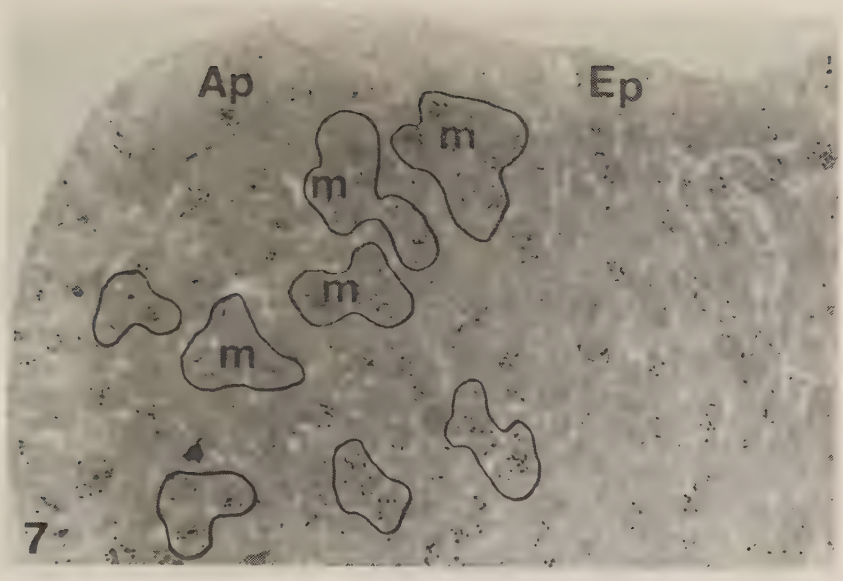
5



6

Abb. 7: Vergrößerung des distalen Bereiches der Extremitäten von Abb. 6.
Ap : Apical ridge
Ep : Epidermis
m : Anordnung der markierten Mesodermzellen in Zellgruppen
Vergrößerung: 1:800

Abb. 8: Vorderextremität nach 6-stündiger Markierung mit ^{3}H-Thymidin am Tag 10.
Ep : Epidermis
Ap : Apical ridge
→ : markierte Mitosen
m : Verteilung der Mesodermzellen ähnlich wie nach 1-stündiger Mesodermzellmarkierung
XX: Gefäße
Vergrößerung: 1:500


Ap
Ep
m
m
m
m
m
7

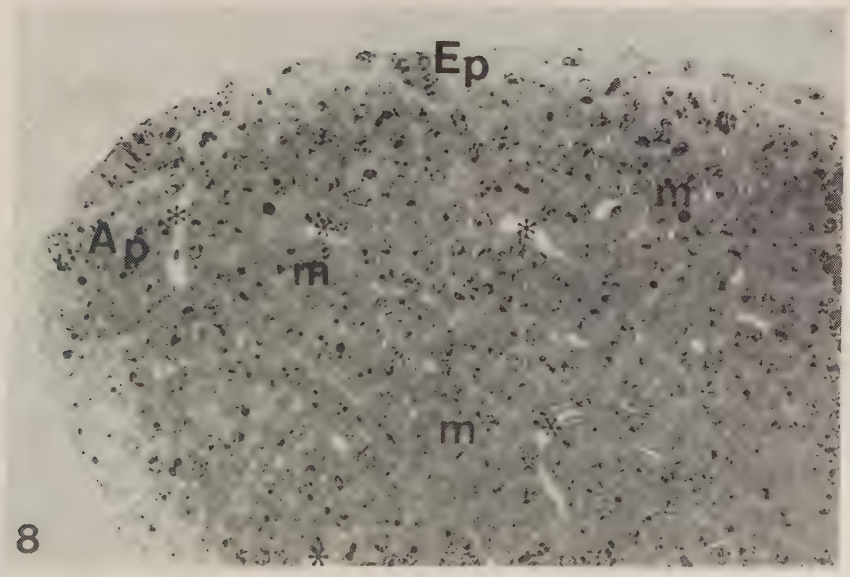

Ep
Ap
m
m
m
m
8

Abb. 9: Querschnitt durch die vordere Extremität am Tag 11.
→ : sich zur Extremität hin aufzweigendes Axon
Vergrößerung: 1:80

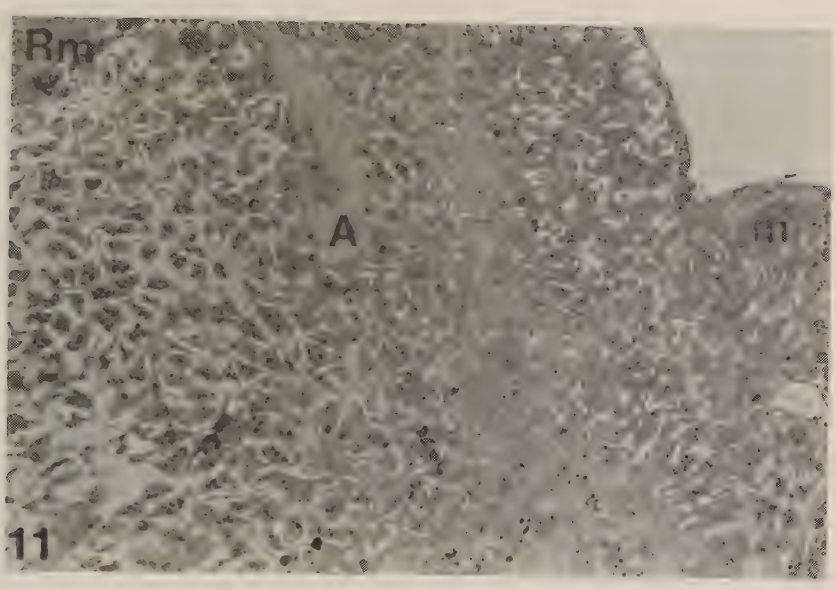
Abb. 10: Vergrößerung von Abb. 9 im Bereich des Übergangs vom Axon zur Extremität.
A : Axon
B : Blastem im Bereich des sich entwickelnden Schultergürtels
* : Verdichtung von Mesodermzellen (beginnende Blastembildung im proximalen Bereich der Extremität)
Vergrößerung: 1:200

9

10

Abb. 11: Bereich des Überganges vom Axon zur Extremität am Tag 11 nach 1-stündiger ^{3}H-Thymidin Markierung.
Rm : Rückenmark
m : Mesoderm im Bereich der Extremität
A : Axon
Vergrößerung: 1:500

Abb. 12: Vergrößerung der Abb. 11.
A : Axon
Ep : Epidermis
m : Mesodermzellen (ventral des sich aufzweigenden Axons)
Vergrößerung: 1:800


Rm
A
m
11

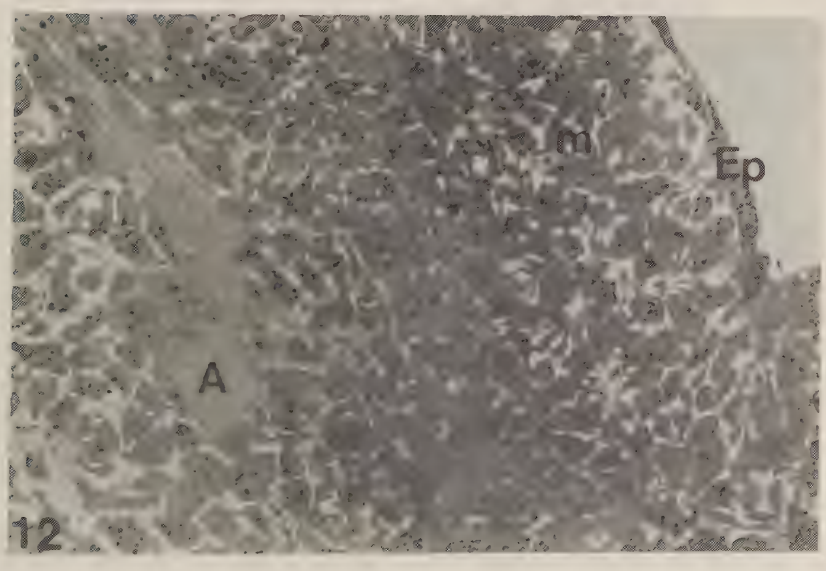
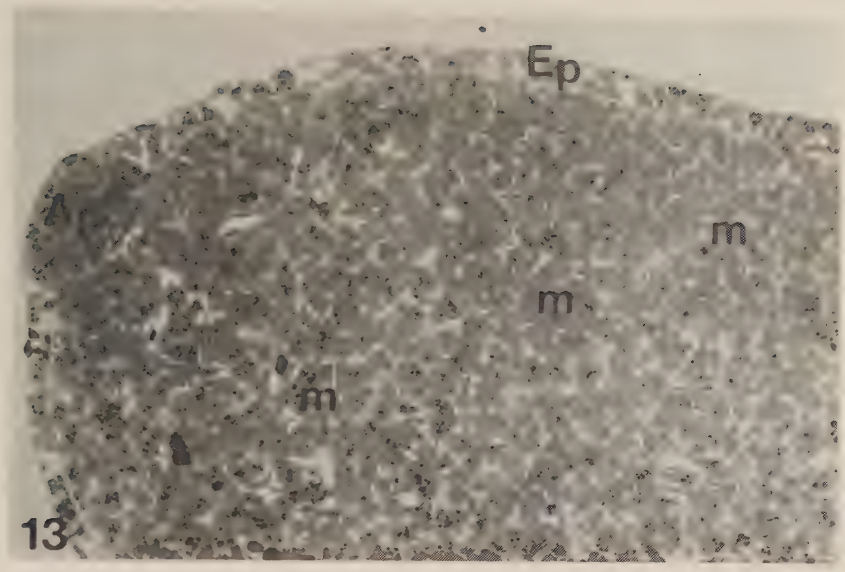

m
Ep
A
12

Abb. 13: Proximaler Teil der vorderen Extremität nach 1-stündiger ^{3}H-Thymidin Markierung am Tag 11.
Ap : Apical ridge
Ep : Epidermis
m : vorwiegend im Zellgruppen angeordnete markierte Mesodermzellen
Vergrößerung: 1:800

Abb. 14: Proximaler Anteil der vorderen Extremität am Tag 11, 30 Stunden nach Markierung mit ^{3}H-Thymidin.
Ap : Apical ridge
m : auch nach diesem Markierungszeitraum keine deutliche Änderung im Verteilungsmuster markierter Mesodermzellen
Vergrößerung: 1:800


Ep
m
m
m
13

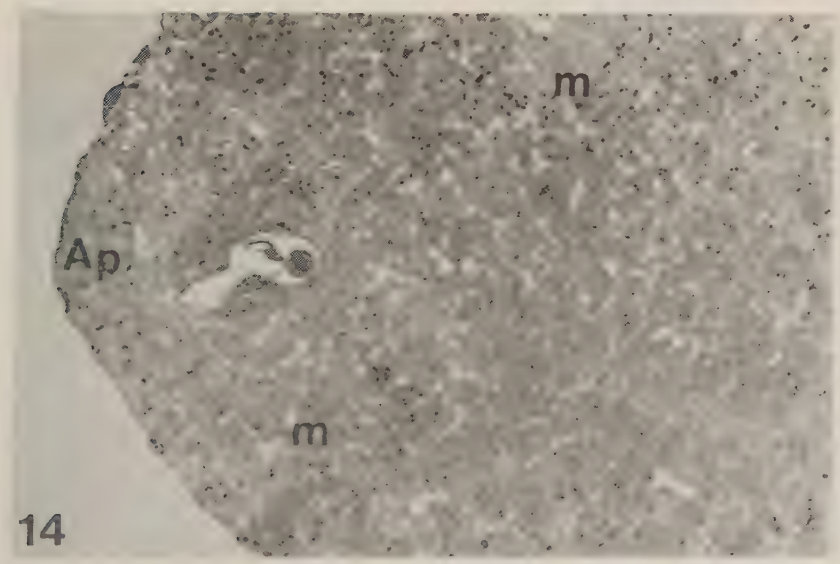
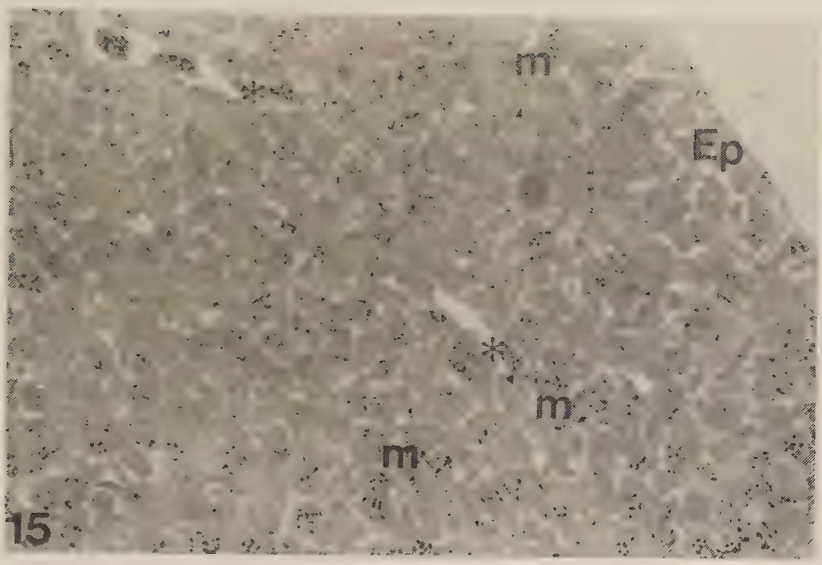

m
Ap
m
14

Abb. 15: Ventraler Bereich in der Mitte der oberen Extremität am Tag 11 nach 1-stündiger Markierung mit ^{3}H-Thymidin.
Ep : Epidermis
m : meist in Gruppen angeordnete markierte Mesodermzellen
* : markierte Gefäßendothelzellen
→ : Mitosen von Mesodermzellen
Vergrößerung: 1:800

Abb. 16: Vergleichbarer Bereich zu Abb. 15; 30 Stunden nach Markierung mit ^{3}H-Thymidin am Tag 11.
m : auch nach diesem Zeitraum noch vorwiegend in Gruppen beieinanderliegende markierte Mesodermzellen
Ep : Epidermis
Vergrößerung: 1:800


m
Ep
m
m
15

Ep
m
m
16

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Professor Dr. med. H.-J. Merker für die Überlassung des Themas bedanken. Herrn Professor Dr. med. R. Herken danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt ferner den Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie und Embryonalpharmakologie der Freien Universität Berlin, besonders aber Frau Heidi Wohlfeil.

Lebenslauf

20.2.1958:	geboren in Bremerhaven als erstes Kind der Lehrerin Rosemarie Weber und des Studienrates Dietrich Weber
1964:	Einschulung in Bremerhaven
1966 - 1971:	Aufenthalt und Schulbesuch in Athen wegen der Tätigkeit meines Vaters an der Deutschen Schule Athen
1976:	Abitur in Bremerhaven
April 1977:	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
Mai 1984:	3. Staatsexamen

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen